

DEFICIÊNCIA PRIMÁRIA DA SECREÇÃO DE INSULINA DE ILHÉUS ISOLADOS DE RATOS GOTO-KAKIZAKI, Um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa.

RAQUEL M. SEIÇA, K.I.SUZUKI, ROSA M.SANTOS, LUÍS M. DO ROSÁRIO

Instituto de Fisiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Coimbra. Department of Medicine. Tohoku Kosei-Nenkin Hospital. Sendai. Japan. Departamento de Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra

RESUMO

A deficiente secreção de insulina é factor determinante da diabetes tipo 2. Para avaliar a evolução da resposta secretora, foi feito um estudo cronológico comparativo entre ratos Wistar normais (W) e ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo genético de diabetes tipo 2 não obesa, da dinâmica da secreção de insulina de ilhéus de Langerhans isolados em resposta à glicose e à arginina, por técnicas de isolamento e de perfusão de ilhéus e técnica de ELISA competitiva. Foi igualmente avaliada a glicémia e a insulinémia em jejum, e a tolerância à glicose.

Observámos, nos ratos W, uma moderada intolerância à glicose nas duas primeiras semanas de vida. Os ratos GK foram sempre intolerantes à glicose e com hiperglicémia e hiperinsulinémia em jejum, após o primeiro mês. Os ilhéus de ratos W foram insensíveis à glicose (1 mM glicose) nas duas primeiras semanas de vida mas exibiram depois uma resposta com características bifásicas bem definidas. Os ilhéus de ratos GK foram sempre irresponsivos à glicose e não adquiriram as características bifásicas da resposta normal. A arginina induziu um aumento da secreção de insulina em qualquer idade e em ambos os modelos animais; mas a resposta dos animais diabéticos foi sempre quantitativamente inferior.

Em conclusão: 1) nos ratos normais, a secreção bifásica, em resposta à glicose, surge somente após a segunda semana de vida, em simultâneo com a estabilização do perfil glicémico; 2) nos ratos diabéticos, a falência insular caracteriza-se pelo compromisso da primeira e da segunda fases da resposta à glicose e pela menor amplitude da resposta à arginina; acompanha o estado de intolerância marcada à glicose e precede a hiperglicémia e a hiperinsulinémia em jejum, constituindo um dos factores patogénicos primários da síndrome diabética.

Palavras-chave: diabetes tipo 2; secreção de insulina; ratos Goto-Kakizaki.

SUMMARY

IMPAIRED INSULIN SECRETION IN ISOLATED ISLETS OF GOTO-KAKIZAKI RATS, AN ANIMAL MODEL OF NON OBESE TYPE 2 DIABETES, IS A PRIMARY EVENT

The development of type 2 diabetes is associated with the impairment of insulin secretion. To evaluate the evolution of the secretory response, a chronological study comparing

normal Wistar (W) vs Goto-Kakizaki (GK) rats, an animal model of non obese type 2 diabetes, was done. Glucose and arginine were tested in collagenase isolated islets of Langerhans with perfusion and ELISA immunoassay techniques. Fasting glycaemia and insulinemia and glucose tolerance were also evaluated.

We have seen, in W rats, a mild glucose intolerance in the first two weeks of age. GK rats were always glucose intolerant with hyperglycaemia and hyperinsulinemia at fasten after one month old. Wistar islets had a characteristic biphasic response to glucose after the first two weeks of age. GK islets were always glucose irresponsive. Arginine induced an increase in insulin secretion in both animal models, independent of age, although GK rats had always a smaller response when compared to W rats.

We concluded that 1) in W rats, a biphasic insulin secretion in response to glucose is observed after the first two weeks of age, simultaneously with glycaemia stabilization 2) in GK rats, both first and second phases of glucose-induced insulin release are significantly reduced and a smaller reduction in response to arginine is observed. This β -cell dysfunction is a primary event in this model of type 2 diabetes, preceding fasting hyperglycaemia and hyperinsulinemia.

Key words: type 2 diabetes; insulin secretion; Goto-Kakizaki rats.

INTRODUÇÃO

É hoje reconhecida como necessária ao estabelecimento da diabetes tipo 2, a presença simultânea de dois defeitos, a insulino-resistência e a falência da secreção de insulina. São presentemente desconhecidos os mecanismos subjacentes à disfunção da célula β , sendo ainda controverso o seu carácter primário ou secundário no processo evolutivo da síndrome diabética.

Os níveis da glicémia regulam a insulino-secreção; interferem em diferentes etapas desde a regeneração celular e a biosíntese, da pró-hormona e da hormona, até à libertação exocitótica da insulina, modulando ainda a resposta da célula β a outros secretagogos. A libertação de insulina em resposta à glicose, *in vivo* e *in vitro*, tem características cinéticas próprias: uma primeira fase que se completa em cinco a dez minutos, com um aumento rápido e transitório da secreção, e uma segunda fase caracterizada por um aumento gradual da libertação da hormona¹. A deficiente secreção de insulina em resposta à glicose, o secretagogo fisiológico mais potente, é considerada uma das características principais da diabetes tipo 2; verifica-se inicialmente a falência da primeira fase da resposta, mesmo nos doentes intolerantes à glicose e nos parentes em primeiro grau de doentes diabéticos, e posteriormente também da segunda fase^{2,3}. A hiperglicémia, resultante da deficiência da secreção e da acção periférica da insulina e da produção aumentada de glicose pelo fígado, assume-se também como um factor de agravamento das múltiplas alterações que incluem o quadro diabético, incluindo a

própria célula β , situação conhecida por glicotoxicidade⁴.

Os ratos Goto-Kakizaki (GK) são um modelo genético de diabetes tipo 2 não obesa, obtido por reprodução selectiva repetitiva de ratos Wistar (índice selectivo, uma modesta intolerância à glicose). A deficiente resposta do pâncreas endócrino dos ratos GK adultos à glicose foi já demonstrada, por vários grupos. No presente estudo comparativo entre ratos Wistar normais (W) e ratos GK procedeu-se à avaliação cronológica do estado glicémico, da insulinémia e da dinâmica da secreção de insulina de ilhéus de Langerhans isolados em resposta à glicose e à arginina, dois insulíntrópicos que actuam de forma diferente na célula β . Desta forma foi possível avaliar a resposta secretora de ilhéus diabéticos jovens e adultos e valorizar o contributo da disfunção insular para a alteração da homeostasia da glicose.

MATERIALE MÉTODOS

1. Animais

Os ratos GK e os ratos W foram provenientes das nossas colónias. Os animais foram mantidos em salas adequadamente ventiladas com temperatura e humidade controladas (22-24°C e 50-60%, respectivamente); foram expostos a ciclos alternados (12h) de luz e obscuridade e alimentados com dieta laboratorial (CRF20-Charles River). Os animais iniciaram uma alimentação mista às três semanas de vida e o desmame foi processado às quatro. Em todos os estudos foram utilizados animais de ambos os

sexos e em diferentes idades do seu desenvolvimento.

2. Glicémia

Após a determinação da glicémia em jejum (jejum de 16-18 horas), foram efectuadas provas de tolerância à glicose via oral (ratos W:n=16-18/idade, ratos GK:n=10-26/idade): administração, por sonda gástrica, de 1,75g de glicose / Kg peso corporal (em água a 25%) com determinação das glicémias aos 30, 60, 90 e 120 minutos. As concentrações da glicose no sangue total foram determinadas na veia da cauda pelo método da glicose-oxidase (*glucometer-Elite-Bayer*).

3. Insulinémia em jejum

A nove animais de cada estirpe com quatro e doze semanas de vida, após um período de jejum de 16-18 horas e determinação da glicémia (método descrito na secção anterior), foram colhidos 1,2 ml de sangue para tubos com 4 mM EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas, durante 10 min, a 1500 rpm e à temperatura de 4°C, e o plasma guardado de imediato a -20°C. A concentração da insulina plasmática foi determinada em duplicado pela técnica de ELISA competitiva (secção 5) e expressa em pmol/L.

4. Isolamento e perfusão de ilhéus de Langerhans

Após a excisão do pâncreas (ratos W:n=7-16/idade, ratos GK:n=8-21/idade), os ilhéus de ratos W e GK foram isolados por digestão enzimática com colagenase P segundo os métodos descritos por Lacy e Kostianovsky⁵ nas três primeiras semanas de vida e por Wollheim *et al*⁶ às quatro e doze semanas. Uma vez isolados, os ilhéus foram mantidos a 37°C em solução salina (120mM NaCl, 5mM KCl, 25mM NaHCO₃, 1,13mM MgCl₂, 2,56mM CaCl₂), suplementada com 8mM glicose e albumina bovina isenta de proteases a 3%, numa atmosfera 95% O₂ / 5% CO₂. No estudo cinético da secreção foi utilizado um sistema dinâmico de perfusão de quatro vias com recolha simultânea e temporalmente regulável. Os ilhéus (4-25) foram colocados em câmaras de 50 µL e perfundidos, a um fluxo constante de 1mL/min, com a mesma solução salina, à temperatura de 37°C e atmosfera 95% O₂ / 5% CO₂. A solução foi suplementada com albumina bovina isenta de proteases a 0,1% e 2mM glicose (G2) durante 45 minutos e 11mM glicose (G11) nos 20 minutos seguintes; seguiu-se a estimulação com 11mM glicose + 20mM arginina (G11+arg20) durante nove minutos. Nalgumas experiências com ilhéus GK, estes foram estimulados durante 60 minutos com 11mM glicose. As amostras recolhidas em fracções de um minuto, foram guardadas a -20°C para posterior determinação, em duplicado, das concentrações de insulina

(expressas em pg/ilhéu/min) pela técnica de ELISA competitiva (secção 5).

5. Determinação da concentração de insulina

As concentrações de insulina, do plasma e dos ilhéus, foram determinadas por técnica de ELISA competitiva com anticorpo directamente imobilizado em fase sólida, conforme descrito por Bergsten e Hellman⁷. Foram contudo introduzidas alterações ao seu procedimento básico. Assim as microplacas foram incubadas, durante 4h a 37°C, com anticorpo de cobaia anti-insulina de rato reconstituído com tampão fosfato salino (1:10) e posteriormente diluído (1:10) em água. A insulina de rato foi utilizada como insulina-padrão. Na preparação das amostras e dos padrões foi utilizada uma solução tampão com Hepes e albumina bovina isenta de proteases a 0,1% e uma solução tampão fosfato com NaCl e albumina a 6%, respectivamente nas determinações da insulina segregada pelos ilhéus e da insulina plasmática. O cromogénio utilizado como substrato para a insulina-peroxidase conjugada foi a tetrametilbenzidina na concentração de 0,5 mg/mL; a reacção processou-se em 30 minutos à temperatura ambiente e foi terminada com ácido sulfúrico a 0,5M. O produto da reacção foi lido por espectrofotometria (*Spectra Vision-React Scientific Ayershire, R.U.*) a 450 nm.

As curvas padrão obtidas com a insulina-padrão em triplicado, tiveram coeficientes de correlação >0,99 sendo os limites de detecção de 100 e 10000 amol/100µL; os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram inferiores a 10%.

6. Materiais

A colagenase P foi adquirida à *Boehringer Mannheim GmbH, Germany* e o anticorpo e a insulina-padrão, à *Linco Research Inc, USA*. Os restantes reagentes foram fornecidos pela *Sigma Chemicals CO St.Louis, USA* e pela *Merck Darmstad, Germany*.

7. Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores médios ± erro padrão da média. Na avaliação estatística da diferença entre os valores médios de dois grupos de resultados foi utilizado o teste t de Student para amostras não emparelhadas e para amostras emparelhadas nas experiências que envolveram observações repetidas; em todos os casos um valor de p<0,05 foi considerado significativo (conforme referenciado nas legendas das figuras).

RESULTADOS

Os ratos W têm uma moderada intolerância à glicose

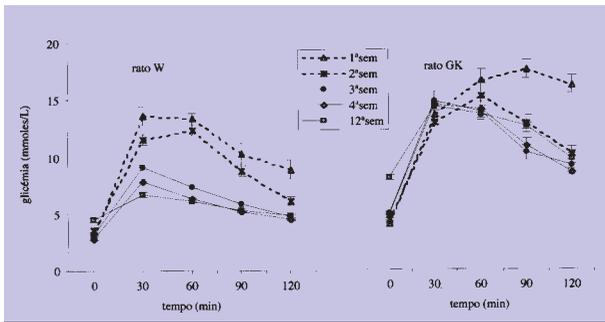


Fig. 1: Glicemia em jejum e prova de tolerância à glicose, em resposta à administração oral de 1,75g de glicose /Kg de peso corporal, de ratos W e de ratos GK. Valor médio \pm e.p.m. Resultados experimentais relativos a: 1ªsem (W n=16, GK n=26); 2ªsem (W n=18, GK n=10); 3ªsem (W n=18, GK n=10); 4ªsem (W n=16, GK n=24); 12ªsem (W n=16, GK n=12).

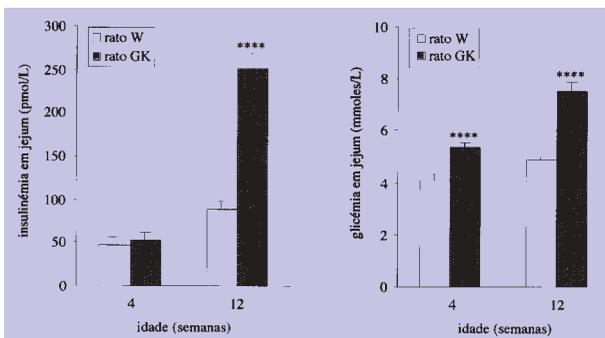


Fig. 2: Valores médios, em jejum, das concentrações de glicose no sangue total e de insulina no plasma de ratos W e de ratos GK com quatro e doze semanas de vida (9 ratos / idade/estirpe).

*** $p < 0,0001$: ratos GK vs ratos W.

nas duas primeiras semanas de vida mas o seu perfil glicémico em resposta à glicose oral estabiliza após esta idade; os ratos GK são sempre intolerantes à glicose (figura 1). Nos ratos diabéticos a hiperglicémia (glicémia $> 5,5$ mM/L) e a hiperinsulinémia em jejum surgem somente após o primeiro mês de vida (Figura 2).

Os ilhéus GK e W com uma e duas semanas de vida são insensíveis ao aumento da concentração de glicose de 2 para 11mM, mas a adição de 20mM arginina induz um aumento da secreção de insulina em ambos os modelos animais; os ilhéus GK têm, contudo, uma menor secreção média basal (G2) e estimulatória (G11 e G11+arg 20) (Figura 3A e 3B). Com três semanas de vida, os ilhéus W mantêm a capacidade de resposta à arginina, tal como os ilhéus GK mas, contrariamente a estes, tornam-se sensíveis à glicose (Figura 3C) com um aumento da secreção aos 20 minutos de 3,32 vezes a secreção média basal.

Os ilhéus W com quatro semanas, exibem uma respos-

ta à glicose tipicamente bifásica com aumentos da secreção média aos 5º e 20º minutos, respectivamente de 6,54 e 17,8 vezes a secreção média basal (Figura 4 A); às doze semanas mantêm estas características cinéticas mas a secreção média basal e estimulatória aumenta (Figura 4B). Os ilhéus GK não adquirem as características fásicas da resposta ao aumento da concentração de 2 para 11mM glicose; de facto, às quatro (Figura 4A) e às doze (Figura 4B) semanas de vida, ambas as fases estão atenuadas com aumentos da secreção média aos 5º e 20º minutos, respectivamente de 1,6-2,3 e 2,3-3,1 vezes a secreção média basal. A dinâmica da resposta dos ilhéus W à arginina, com um

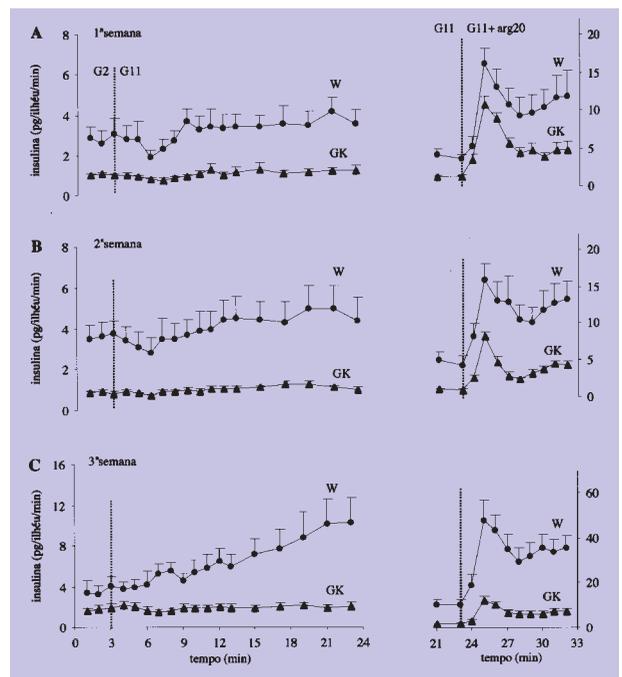


Fig. 3: Secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos W e GK em resposta ao aumento de 2 para 11mM glicose e em resposta a 11mM glicose+20mM arginina. Os resultados estão expressos (média \pm e.p.m.) em pg de insulina libertada por cada ilhéu num minuto. Resultados experimentais relativos a: 1ªsem (W n=7, GK n=9); 2ªsem (W n=8, GK n=8); 3ªsem (W n=10, GK n=8).

pico de secreção ao 2º ou 3º minutos da estimulação, mantém-se com a progressão da idade mas a amplitude desta resposta aumenta substancialmente às quatro (Figura 4 A) e às doze (Figura 4 B) semanas de vida. As características cinéticas da resposta dos ilhéus GK à arginina estão mantidas nestas idades mas a sua amplitude é, no entanto, inferior à dos controlos (Figura 4 A e 4 B). Os ilhéus GK não aumentam a secreção de insulina quando estimulados mais de 20 minutos com 11mM glicose (experiências de 60 minutos) (Figura 5).

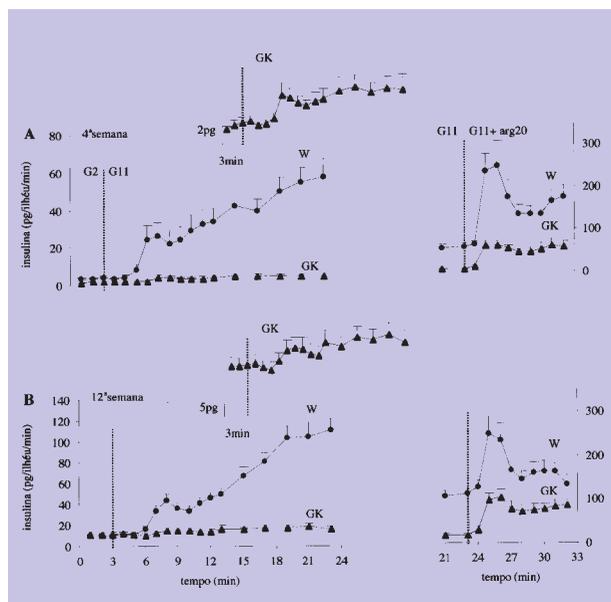


Fig. 4: Secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos W e GK em resposta ao aumento de 2 para 11mM glicose e em resposta a 11mM glicose+20mM arginina. Os resultados estão expressos (média ± e.p.m.) em pg de insulina libertada por cada ilhéu num minuto. Resultados experimentais relativos a: 4ªsem (W n=7, GK n=8); 12ªsem (W n=16, GK n=21).

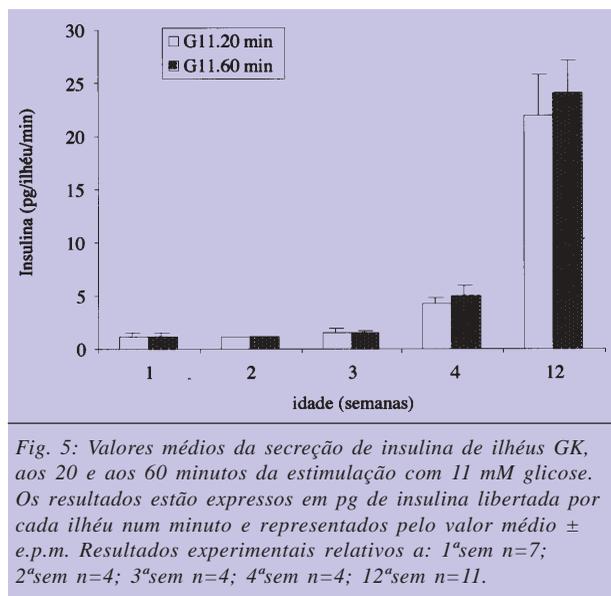


Fig. 5: Valores médios da secreção de insulina de ilhéus GK, aos 20 e aos 60 minutos da estimulação com 11 mM glicose. Os resultados estão expressos em pg de insulina libertada por cada ilhéu num minuto e representados pelo valor médio ± e.p.m. Resultados experimentais relativos a: 1ªsem n=7; 2ªsem n=4; 3ªsem n=4; 4ªsem n=4; 12ªsem n=11.

DISCUSSÃO

Confirmámos, com este estudo, a incapacidade do pâncreas endócrino normal em responder à glicose no início da vida extra-uterina que, nos ratos W, se associa a uma moderada e transitória intolerância à glicose. Este estudo mostrou ainda que os ratos GK, intolerantes à glicose desde o nascimento, não adquirem as características bifásicas

da secreção de insulina em resposta à glicose; mantém sempre uma falência da primeira e da segunda fases da resposta secretora, disfunção esta que precede a hiperglicémia e a hiperinsulinémia em jejum.

É conhecida a imaturidade funcional do pâncreas endócrino na vida fetal e no período pós-natal⁸. Esta disfunção parece relacionar-se com deficiências da proteína cinase c⁹ e do metabolismo da glicose. De facto, os canais de potássio dependentes de ATP (K⁺ATP) e os de cálcio sensíveis à voltagem (CSV) estão presentes e funcionais^{10,11} e, contrariamente à glicose, os ilhéus respondem a outros secretagogos como a arginina, o gliceraldeído e a leucina¹². Os nossos estudos confirmam esta falência dos ilhéus W no início da vida extra-uterina; são incapazes de responder à glicose (11mM) mas exibem uma resposta à arginina com características cinéticas bem definidas, embora quantitativamente menor que a resposta do adulto. A evolução do perfil glicémico dos ratos normais durante o primeiro mês de vida parece seguir a evolução da resposta secretora dos ilhéus sugerindo que a deficiência transitória do pâncreas endócrino poderá ser responsável, pelo menos em parte, pela moderada intolerância à glicose dos ratos W, no início da vida extra-uterina.

Uma lesão a qualquer nível, desde a biossíntese, da pró-hormona e da hormona, e as vias de acoplamento estímulo-secreção até à exocitose, poderá contribuir para a redução da secreção na diabetes tipo 2. Os estudos feitos, em ratos GK adultos, não são suficientemente esclarecedores sobre o ou os defeitos subjacentes à deficiente secreção de insulina neste modelo animal. A biossíntese não parece estar afectada¹³ nem foram detectadas alterações relevantes no GLUT 2, a proteína transportadora da glicose na célula β¹⁴, nem na glucocinase¹⁵. As propriedades dos canais K⁺ATP^{15,16} e CSV¹⁶ estão mantidas, mas sugere-se uma falência da regulação destes canais pela glicose, por diminuição dos níveis de ATP. Esta diminuição pode relacionar-se com a menor actividade da m-GDH mitocondrial, capaz de comprometer o vaivém do glicerol-fosfato e a oxidação da glicose^{17,18} e com o aumento da actividade da glicose-6-fosfatase (ciclo fútil da glicose)^{19,20}. Estas lesões não parecem contudo ser suficientes para explicar as anomalias da secreção sendo ainda discutível o seu carácter primário ou secundário à hiperglicémia^{21,22}. As deficiências do metabolismo da glicose são indiscutivelmente capazes de comprometer a função da célula β mas outros defeitos parecem contribuir para a falência da secreção dos ilhéus GK, nomeadamente os das proteínas envolvidas na exocitose^{23,24}.

Demonstramos com este estudo que as alterações

quantitativas e qualitativas da secreção dos ilhéus diabéticos em resposta ao aumento da concentração de glicose, e que se caracterizam pela falência da primeira e da segunda fases da resposta, acompanham a intolerância à glicose e precedem a hiperglicemia em jejum. A redução primária e moderada da massa de células β dos ratos GK da nossa colônia (artigo em impressão) poderá ser responsável pelas alterações quantitativas (diminuição da amplitude das respostas à glicose e à arginina) observadas em qualquer idade, mas não justifica *per se* as alterações qualitativas (ausência do padrão bifásico da resposta secretora do ilhéu diabético à glicose). De facto, nas duas primeiras semanas de vida, a falência da cinética da libertação de insulina dos ilhéus diabéticos em resposta à glicose, poderá relacionar-se, tal como os ilhéus normais, com a imaturidade do pâncreas endócrino; e a menor massa de células β poderá ser responsável pelos níveis mais baixos da secreção média basal e estimulatória. Mas, a partir da segunda semana, a ausência de uma resposta à glicose com características bifásicas definidas e a integridade da dinâmica da resposta à arginina sugerem que a disfunção da célula β diabética, que se associa à redução da massa celular, constitui o factor principal da deficiência da secreção da hormona.

Os ratos GK da nossa colônia são hiperglicémicos e hiperinsulinémicos, em jejum, somente após o primeiro mês de vida sugerindo que a insulino-resistência, nomeadamente hepática², se expressa mais tarde, resultado concordante com os trabalhos de outros autores^{25,26}.

CONCLUSÕES

Com este estudo é possível afirmar que o reconhecimento da glicose pela célula β normal se desenvolve somente depois do nascimento o que sugere a imaturidade, no início da vida extra-uterina, de alguns dos mecanismos de reconhecimento da glicose pela célula β .

A avaliação cronológica da capacidade dos ilhéus GK em segregar insulina permite considerar a deficiência funcional da célula β como um dos factores patogénicos primários da síndrome diabética neste modelo animal não obeso. Caracteriza-se, à semelhança da diabetes humana, por uma falência da primeira e da segunda fases da secreção de insulina em resposta à glicose, envolvendo como tal os mecanismos celulares subjacentes a este padrão dinâmico (aspectos importantes a clarificar e que envolvem as vias dependente e independente do K^+ ATP). A emergência da diabetes é, contudo, o resultado da congregação de diversos factores: a redução da massa celular e a disfunção da célula β , como factores primários, aos quais se associa mais tarde a insulino-resistência.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a João Patrício, director do Laboratório de Investigação Experimental dos HUC, e colaboradores, Maria de Lurdes Silva, Carlos Silva e Paulo Pereira, a manutenção dos animais e a colaboração técnica prestada nos estudos *in vivo* e ao técnico do Instituto de Fisiologia da F.M.U.C., Mário Simões, a colaboração técnica prestada nos estudos *in vivo* e *in vitro*. A Peter Bergsten, do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Uppsala, Suécia, a nossa gratidão pelo apoio prestado na implementação do ensaio ELISA.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

BIBLIOGRAFIA

1. NESHER R, CERASI E: Signal modulation for phasic insulin release in normal and diabetic pancreatic B-cells. In: Flatt P, Lenzen S., eds *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*. London, UK: Smith-Gordon and Company Limited 1994: 411-419.
2. DeFRONZO RA: Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 1997; 5: 177-269.
3. MATTHEWS DR, CLARK A: B-cell defects and pancreatic abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: Pickup J, Williams G, eds *Textbook of Diabetes*. London, UK: Blackwell Science Ltd 1997: 21.1-21.16.
4. SIMONSON DC, ROSSETTI L, GIACCARI A et al: Glucose toxicity. In: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd 1997: 713-744.
5. LACY PE, KOSTIANOVSKY M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39.
6. WOLHEIM CB, MEDA P, HALBAN PA: Isolation of pancreatic islets and primary culture of the intact microorgans or of dispersed islet cells. In: Fleischer S, Fleischer B, eds *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., EUA 1990: 188-223.
7. BERGSTEN P, HELLMAN B: Glucose-induced amplitude regulation of pulsatile insulin secretion from individual pancreatic islets. *Diabetes* 1993; 42: 670-674.
8. BLISS CR, SHARP GWG: Development of glucose responsiveness from the fetal to the adult B-cell. In: Flatt P, Lenzen S., eds *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*. London, UK: Smith-Gordon and Company Limited 1994: 69-76.
9. FLETCHER DJ, WAYS DK: Age-dependent expression of protein kinase C isoforms in rat islets. *Diabetes* 1991; 40: 1496-1503.
10. HOLE RL, PIAN-SMITH MCM, SHARP GWG: Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1988; 254: E167-E174.
11. RORSMAN P, ARKHAMMAR P, BOKVIST K et al: Failure of glucose to elicit a normal secretory response in fetal pancreatic beta cells results from glucose insensitivity of the ATP-regulated K^+ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4505-4509

12. WEINHAUS AJ, PORONNIK P, COOK DI et al: Insulin secretagogues, but not glucose, stimulate an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the fetal rat β -cell. *Diabetes* 1995; 44: 118-124.
13. GIROIX M-H, VESCO L, PORTHA B: Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes. *Endocrinol* 1993; 132: 815-822.
14. OHNEDA M, JOHNSON JH, INMAN LR et al: GLUT2 expression and function in β -cells of GK rats with NIDDM. Dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 1993; 42: 1065-1072.
15. TSUURA Y, ISHIDA H, OKAMOTO Y et al: Glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels is impaired in β -cells of the GK rat. A new genetic model of NIDDM. *Diabetes* 1993; 42: 1446-1453.
16. HUGHES SJ, FAEHLING M, THONELEY CW et al: Electrophysiological and metabolic characterization of single β -cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 1998; 47: 73-81.
17. ÖSTENSON C-G, ABDEL-HALIM SM, RASSCHAERT J et al: Deficient activity of FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase in islets of GK rats. *Diabetologia* 1993; 36: 722-726.
18. FABREGAT ME, NOVIALS A, GIROIX M-H et al: Pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase deficiency in two animal models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 1020-1023.
19. ÖSTENSON CG, KHAN A, ABDEL-HALIM SM et al: Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. *Diabetologia* 1993; 36: 3-8.
20. CAO HL, KHAN A, ÖSTENSON CG et al: Increased glucose-6-phosphatase activity in islets from spontaneously diabetic GK rats. *Diabetologia* 1995; 38 (Suppl 1): 552A 143 (abst.).
21. MACDONALD MJ, EFENDIC S, ÖSTENSON CG: Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rat. *Diabetes* 1996; 45: 886-890.
22. LING ZC, HONG-LIE C, ÖSTENSON CG: Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islet. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl 1): S108-S112.
23. METZ SA, MEREDITH M, VADAKEKALAM J et al: A defect late in stimulus-secretion coupling impairs insulin secretion in Goto-kakizaki diabetic rats. *Diabetes* 1999; 48: 1754-1762.
24. NAGAMATZU S, NAKAMICHI Y, YAMAMURA C et al: Decreased expression of t-SNARE, Syntaxin 1 and SNAP-25 in pancreatic β -cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islet. Restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* 1999; 48: 2367-2373.
25. PICAREL-BLANCHOT F, BERTHELIER C, BAILBÉ D et al: Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1996; 271: E755-E762.
26. BISBIS S, BAILBÉ D, TORMO MA et al: Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1993; 265: E807-E813.

